

## НЕЙРОАКТИВИРУЮЩИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТРОФИНОТРОПИНА ЦЕРЕБРАЛА

А. Н. Макаренко<sup>1</sup>, И. Г. Васильева<sup>2</sup>

Показано, что церебрал и его низкомолекулярные вещества с мол. массой до 500 Д, выделенные из суммарного средства церебрала, повышают уровень синтеза и секреции фактора роста нервов в условиях экспериментального геморрагического инсульта и вместе с тем не влияют на синтез и секрецию данного ростового фактора у интактных животных. Установлено, что такое нейроактивирующее действие трофинотропина церебрала и его низкомолекулярных компонентов в остром периоде развития геморрагического инсульта достигается при интраназальном пути их введения. По сравнению с парентеральным путем (внутрибрюшинно), интраназальный путь введения является наиболее оптимальным для проникновения молекул церебрала в ЦНС, минуя гематоэнцефалический барьер. Трофинотропины являются новым классом лекарственных средств с нейроактивирующим механизмом действия на процессы синтеза и секреции фактора роста нервов при остром геморрагическом инсульте.

**Ключевые слова:** нейроактивирующее действие, церебрал, экспериментальный геморрагический инсульт, фактор роста нервов мРНК, интраназальный путь введения

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение восстановительных процессов, протекающих в ЦНС при острых цереброваскулярных заболеваниях, является самостоятельной проблемой, решение которой необходимо для восстановления утраченных или нарушенных мозговых функций различного генеза.

Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют об эффективности использования для лечения не только острого геморрагического инсульта (ГИ), но и хронической недостаточности мозгового кровообращения церебролизина (“Еbewe”, Австрия) при монотерапии, или в сочетании с другими лекарственными препаратами. Последний вариант существенно повышает эффективность его терапевтического действия [4, 28]. С другой стороны, основным недостатком церебролизина и других аналогичных средств (церебролизат, липоцеребрин, цереброкурин, др.) является отсутствие сведений о действующем, т.е. активном, “начале” возможности его выделения из смеси веществ, структуре и физико-химических свойствах, и о механизме фармакологического действия [2, 13, 18].

В последние годы основное внимание исследователей церебролизина было сосредоточено на изучении роли молекул нейротрофических факторов и других пептидных веществ (но не смеси аминокислот), входящих в его состав, в механизме его действия [3, 5, 14,

27]. Проблема фармакотерапии инсульта, демиелинизирующих заболеваний и энцефалопатии с помощью природных нейротикинов (BDNF, NGF) и их фрагментов находится на стадии изучения [11, 12, 25, 27], что связано с поиском и изучением роли возможных регуляторов нейропептидных и нейротрофических факторов эндогенного происхождения. В частности, нами предложен поликомпонентный препарат церебрал [1, 20].

Целью исследования явилось изучение трофинотропной активности низкомолекулярных веществ (мол. масса до 500 Д), полученных из церебрала, т.е. оценка их влияния на процессы синтеза и секреции фактора роста нервов (ФРН) в мозге опытных животных с экспериментальной моделью ГИ.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

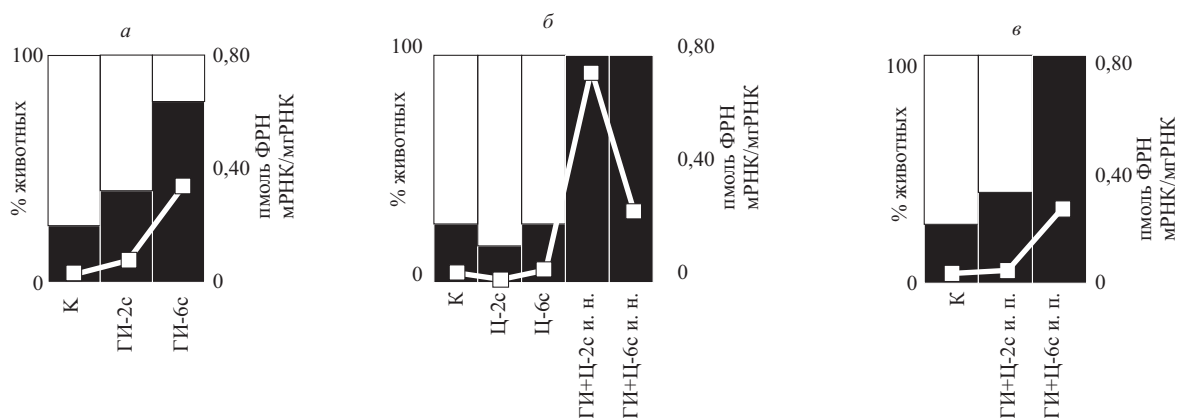
Использованы самцы белых крыс массой 180 – 210 г.

**Моделирование геморрагического инсульта.** В фронтотемпоральной области головы, наркотизированных животных (этамилал – натрия 40 мг/кг, внутрибрюшинно, однократно), были произведены 5 мм разрезы кожи, в костях черепа просверлены отверстия диаметром 0,5 мм. Модель билатерального аутогеморрагического инсульта воспроизводили стереотоксически (А. Paxinos, Ch. Watson, 1986) [22] инъекцией 100 мкл аутокрови интрацеребрально в область внутренней капсулы (С. I.) [6]. Морфологический контроль зоны субнеокортикального поражения проводили на окрашенных фронтальных срезах мозга нейтральным красным или по методу Ниссля [10].

**Экспериментальные группы.** Животные разделены на 10 экспериментальных групп по 5 – 6 в каждой. Контроль — интактные животные (1-я группа); ложнопериованные животные (2-я), у которых были сделаны разрезы кожи длиной 5 мм и просверлены отверстия в черепе:  $l = 3$  мм и  $d = 0,5$  мм, наложенные швы, а через 6 дней животных брали в опыт; 3-я — интактные животные + церебрал интраназально на протяжении 2 дней; 4-я — интактные животные + церебрал интраназально на протяжении 6 дней; 5-я — животные через 2 дня после ГИ; 6-я

<sup>1</sup> Лаборатория ультраструктурных и цитохимических основ условного рефлекса (зав. — проф. Н. С. Косицын) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 117485, ул. Бултерова, 5а.

<sup>2</sup> Лаборатория биохимии и патофизиологии (зав. — И. Г. Васильева) НИИ нейрохирургии АМН Украины им. акад. А. П. Родоманова, Киев, 03022, ул. Мануильского, 8.



Влияние церебрала на экспрессию мРНК фактора роста нервов (ФРН) в мозге крыс с экспериментальным геморрагическим инсультом (ГИ):

*а* – влияние ГИ на экспрессию мРНК ФРН в мозге крыс; *б* – влияние интраназального введения Церебрала на экспрессию мРНК ФРН в мозге животных с ГИ; *в* – влияние внутрибрюшинного введения церебрала; темные столбики – животные с экспрессией мРНК ФРН в ткани головного мозга; светлые столбики – животные без экспрессии мРНК ФРН в ткани головного мозга; кривая линия – уровень экспрессии мРНК ФРН в мозге крыс.

ГИ-2с – два дня после геморрагического инсульта; ГИ-6с – шесть дней после геморрагического инсульта; Ц-2с и. н. – интраназальное введение Церебрала в течение 2 дней; Ц-6с и. н. – интраназальное введение Церебрала в течение 6 дней; ГИ+Ц-2с и. н. – интраназальное введение Церебрала в течение 2 дней после ГИ; ГИ+Ц-6с и. н. – интраназальное введение Церебрала в течение 6 дней после ГИ; ГИ+Ц-2с и. п. – внутрибрюшинное введение Церебрала в течение 2 дней после ГИ; ГИ+Ц-6с и. п. – внутрибрюшинное введение Церебрала в течение 6 дней после ГИ.

— животные через 6 дней после ГИ; 7-я — животные с ГИ + церебрал, интраназально, в течение 2 дней; 8-я — животные с ГИ + церебрал, интраназально, в течение 6 дней; 9-я — животные с ГИ + церебрал, внутрибрюшинно, в течение 2 дней; 10-я — животные с ГИ + церебрал, внутрибрюшинно, в течение 6 дней.

При интраназальном введении в каждую ноздрю крысы ежедневно вводили по 2 капли раствора церебрала, содержащего 0,2 мг белка, а при внутрибрюшинном введении — 200 мкл (0,4 мкг белка).

Операции проводили под этиминал-натриевым наркозом (стадия — Ш<sub>1-2</sub>). Животных декапитировали, мозг извлекли, замораживали в жидком азоте и сохраняли до момента использования.

Суммарную РНК из мозга крысы получали фенолхлороформным методом; гибридизацию проводили с использованием <sup>32</sup>Р-меченного кДНК — зонда gcacctgacaaggtgtgagctggtgcagatgatgagtc (“Pharmacia Biotech”) в соответствии со стандартной процедурой [24].

Статистическую значимость различий определяли с учетом  $p < 0,05$  (Ut) (Манна – Уитни) [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Появление и повышение уровня ФРН в тканях мозга у взрослых животных при травме, нейрохирургических вмешательствах и при экспериментальном инсульте явились основанием для изучения возможности регуляции процессов экспрессии и метаболизма мРНК ФРН в структурах мозга при моделировании ГИ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что мРНК ФРН обнаруживаются у 40 % белых крыс 5-й группы с экспериментальным ГИ через 2 дня после моделирования патологии, и у 100 % животных 6-й группы — через 6 дней. Данные, полученные с использованием гибридизационной технологии указывают на достоверное превышение контрольного показателя (0,39 пмоль мРНК ФРН/мг РНК; Ut,  $p = 0,041$ ).

В отличие от этого у животных 2-й группы отмечается некоторое изменение данного показателя. Эксп-

рессия мРНК ФРН обнаруживалась в ткани мозга только у 1 животного. Следовательно, изменение экспрессии мРНК ФРН на 2-е и, особенно, 6-е сутки после моделирования ГИ, и отсутствие динамики у ложноперированных животных исключает влияние подготовительной хирургической процедуры при моделировании ГИ на экспрессию ФРН в мозге половозрелых крыс. Таким образом, моделирование геморрагического инсульта и поступление аутокрови в ткань мозга сопровождается развитием не только структурных нейро-глиальных нарушений (гибель нейронов, процессы отека – набухания, реактивный астроцитоз), но и нарушением церебрального метаболизма, о чем, в частности, свидетельствует повышение экспрессии мРНК ФРН в различных образованиях головного мозга у подавляющего большинства опытных, но не у ложноперированных крыс. Следует также учитывать, что молекулы ФРН синтезируются преимущественно в нейронах, но не в глиальных клетках [23].

Анализ результатов следующей серии опытов показал, что действие церебрала в течение первых 2-х и 6-х суток во многом определялось системой доставки низкомолекулярных веществ препарата в мозг. В частности, при интраназальном введении церебрала у животных с ГИ на протяжении 2 сут (7-я группа) существенно ускорял экспрессию мРНК ФРН, который определялся в ткани мозга каждого животного. Ее средний уровень статистически достоверно превосходил соответствующий показатель опытных крыс и составлял 0,74 пмоль мРНК ФРН/мг РНК, Ut,  $p = 0,051$  (рисунок). Следовательно, интраназальный путь введения препарата позволяет быстро, благодаря использованию механизма ретроградного аксонного транспорта молекул, ускорить процессы экспрессии мРНК ФРН и синтеза в клетках мозга молекул ФРН в случае

развития острого ГИ, тем самым препятствуя возникновению фазы декомпенсации и предотвращая гибель опытных животных. Данный эффект cerebrala сохраняется и у животных 8-й группы, т.е. и через 6 дней после начала его введения интраназально. При такой постановке опытов, мРНК ФРН обнаруживается в мозге всех животных и составляет 0,25 пмоль мРНК ФРН/мг РНК;  $U_t$ ,  $p = 0,043$ , что соответствует уровню у не леченых животных с ГИ к данному сроку наблюдения. Следует отметить две отличительные особенности, установленные при проведении данной серии опытов. Использование интраназального пути введения cerebrala у интактных животных 3-й и 4-й групп, т.е. на протяжении 2 и 6 дней не оказало влияния на молекулярный механизм увеличения уровня мРНК ФРН в мозге крыс в отличие от резко выраженной экспрессии мРНК ФРН у животных с экспериментальным ГИ. С другой стороны, определение в мозге животных мРНК ФРН и изучение его среднего уровня у опытных животных продемонстрировало меньшую эффективность при его внутрибрюшинном введении. Динамика накопления мРНК ФРН в ткани мозга животных 9-й и 10-й групп напоминает такую у опытных не леченых животных (5-я и 6-я группы), но представлена у большего количества крыс. В частности, экспрессия мРНК ФРН на 2-й день эксперимента определялась у 40 %, а на 6-й день внутрибрюшинного введения cerebrala — у всех животных. Уровни мРНК ФРН в ткани мозга, составившие соответственно 0,15 ( $p = 0,032$ ) и 0,26 ( $p = 0,027$ ) пмоль мРНК ФРН/мг РНК;  $U_t$ , приближались к показателям у не леченых животных на 6-е сутки опыта и существенно превосходили аналогичный показатель у крыс контрольной группы (рисунок).

Следовательно, при моделировании острого ГИ в раннем восстановительном периоде клетки мозга продуцируют информационные молекулы, которые способствуют развитию адаптивных реакций мозга и оказывают не только нейропротекторное действие, обеспечивающее выживание нервных клеток, но и нейроактивирующее, и трофинотропное влияние, сопровождающееся ускорением процессов регенерации, спрутинга и неосинаптогенеза. В соответствии с высказанной гипотезой о физиологической роли трофинотропинов можно полагать, что одной из ведущих общебиологических реакций клеток на повреждение является образование трофинотропных молекул, обеспечивающих в ЦНС выживание нейронов посредством увеличения экспрессии мРНК ФРН, повышения синтеза и секреции других ростовых факторов, образующихся в мозге.

Проведенные эксперименты позволили установить, что синтез ФРН, в свою очередь, находится под контролем и влиянием нейронов различных отделов мозга, выделяющих на определенных этапах течения ГИ (в раннем постинсультном периоде) информационно-сигнальные вещества — трофинотропины. Они

важны как для интрацеребральной передачи информации, так и для регуляции, или повышения активности репаративных процессов в поврежденных тканях, необходимы для развития адаптивных реакций и устойчивости клеток мозга, что чрезвычайно важно для повышения выживаемости организма в целом [8, 9]. Результаты исследований подтвердили ранее высказанную гипотезу об усилении экспрессии мРНК ФРН под влиянием низкомолекулярных водорастворимых веществ из ткани мозга с ГИ, т.е. о наличии и существенной роли молекул трофинотропинов, важности поиска, выделения, изучения их свойств, и путей возможного получения данного типа веществ для лечения острых и хронических цереброваскулярных заболеваний.

В результате экспериментов было показано более эффективное повышение синтеза и секреции ФРН в ЦНС при интраназальном пути введения cerebrala, чем при внутрибрюшинном в связи с ускоренной доставкой его молекул в мозг. Эти данные свидетельствуют о возможности ретроградного аксонного транспорта низкомолекулярных веществ по волокнам обонятельного анализатора после взаимодействия с соответствующими рецепторами и об их накоплении в ЦНС в значительно больших количествах, чем при внутрибрюшинном пути введения [15, 16, 21].

Анализ и обобщение полученных результатов свидетельствуют о появлении в ЦНС при развитии травматической гематомы или ГИ не только значительного количества веществ, относящихся к группе нейротрофических и ростовых факторов, но и о накоплении после воспроизведения ГИ даже в неповрежденных участках мозга (неокортекс) вновь синтезированных информационных молекул-регуляторов, получивших название трофинотропинов, которые обеспечивают развитие адапционно-приспособительных реакций, выживание клеток, а также активируют и стимулируют процессы регенерации и, вероятно, спрутинга [9, 20]. Эти реакции сопровождаются повышением выживаемости животных с последующим восстановлением нарушенных функций мозга. В механизме их развития лежит и усиление экспрессии мРНК ФРН, а также, видимо, синтез и секреция других ростовых факторов под влиянием эндогенно синтезированных фармакологически активных веществ трофинотропинов. Ранее полученные результаты свидетельствуют о возможности ускорения процессов восстановления неврологического повреждения с помощью трофинотропина, оказывающего не только протекторное, но и отчетливое нейроактивирующее действие на образования мозга при развитии острой интрацеребральной геморрагии. С другой стороны, существенной является возможность регуляции процессов синтеза и секреции ФРН, предотвращающего гибель нейронов и обеспечивающего репарацию нервной ткани, в том числе при инсульте и оксидативном стрессе с помощью стабильных низкомолекулярных регуляторных факторов

[17, 19, 26]. Видимо благодаря ретроградному аксонному транспорту трофинотропин не задерживается гематоэнцефалическим барьером и проникает в ЦНС, что может способствовать усовершенствованию методов лечения ГИ.

И, наконец, анализ и обобщение полученных результатов не исключает возможности образования в тканях, при повреждении которых образуются факторы роста (FGF, EGF) других низкомолекулярных регуляторов, более высокого уровня, т.е. up-regulators, оказывающих влияние на синтез и секрецию цитокинов как на этапе раннего гистогенеза, так и в условиях острой экспериментальной травмы не только ЦНС, но и других тканей (лимфоидные органы, кровь, трубчатые кости и др.) [2].

## ВЫВОДЫ

1. Cerebrala и его низкомолекулярные вещества не влияют на синтез и секрецию фактора роста нервов у интактных животных.

2. Cerebrala активизирует синтез и секрецию фактора роста нервов в условиях экспериментального острого геморрагического инсульта.

3. Интраназальный путь введения cerebrala является оптимальным в отличие от внутривенного.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Аркадьев, Л. В. Новик, А. Ю. Пустоваров и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 20 – 23 (2002).
2. Е. М. Важничая, Т. А. Девяткина, *Ноотропы и система крови в условиях стресса*, Полимет, Полтава (2002).
3. О. А. Громов, А. В. Кудрин, *Нейрохимия макро- и микроэлементов. Новые подходы к фармакотерапии*, Алев-В, Москва (2001).
4. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, М: Медицина, Москва (2001).
5. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшова, Н. Н. Вольский, В. А. Козлов, *Усп. совр. биол.*, **5**, 440 – 450 (1999).
6. Н. С. Косицын, С. В. Карпенко, А. Н. Макаренко, В. А. Мишина, *Способ моделирования геморрагического инсульта*, А.с. № 17675118 А1 от 08.06.1992 г.
7. С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel.*, Морион, Киев (2000).

8. А. Н. Макаренко, Ю. М. Корольков, С. В. Касьянов, *Сб. научн. тр.*, КМАПО, вып. 7, кн. 1, Киев 1998), 751 – 754.
9. А. Н. Макаренко, *Тез. докл. Национального съезда фармакологов Украины (1 – 4 ноября 2001 г.)*, Днепропетровск (2001).
10. Г. А. Меркулов, *Курс патогистологической техники*, Медицина, Ленинград (1969).
11. К. А. Семенова, О. А. Громова, Ю. М. Кулагина, А. В. Скальный, *Микроэлементы в медицине*, **2**(4), 40 – 43 (2001).
12. L. Aloe, L. Bracci, S. Bonini, and L. Manni, *Allergy*, **52**(9), 883 – 894 (1997).
13. L. Benowitz, *J. Eur. Neuropsychopharm.*, **10**(S. 4, S. 12), 23 (2000).
14. R. J. Boado, *Neurosci. Lett.*, **225**(30), 147 – 150 (1998).
15. M. Dahlin, U. Bergman, B. Janson, et al., *Pharm. Res.*, **17**(5), 737 – 742 (2000).
16. H. L. Fehm, B. Perras, R. Smolnik, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **405**(1), 43 – 54(2000).
17. Z. H. Guo and M. P. Mattson, *Cerebr. Cortex.*, **10**(1), 50 – 57 (2000).
18. M. B. Gonzalez, L. Francis, and O. Castellano, *J. Neural Transm.*, **52**(7), 333 – 341 (1998).
19. T. Kawamata, E. K. Speliotes, and S. P. Finkelstein, *J. Adv. Neurol.*, **73**(6), 377 – 382 (1997).
20. A. N. Makarenko, V. Ph. Danilenko, Yu. N. Koroliov, and S. V. Kasianov, *4th nt. Cong. SONA 99 (Dakar, Senegal, 12 – 16 April, 1999)*, Dakar(1999), 127.
21. H. W. Nielsen, E. Bechgaard, B. Twile, et al., *Jnt. J. Pharmacol.*, **204**(1), 35 – 41 (2001).
22. G. Paxinos and Ch. Watson, *Stereotaxic atlas the rat brain.*, Acad. Press. (1986).
23. J. S. Rudge, E. M. Pasnikowski, P. Holst, and R. M. Lindsay, *J. Neurosci.*, **15**, 6856 – 6867 (1995).
24. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. (1989).
25. T. Satou, T. Hoh, Y. Tamai, *J. Neural. Transm.*, **107**(11), 1253 – 1262 (2000).
26. D. Tajrine, L. Garofalo, A. S. Cuello, and A. Ribeiro-da-Silva, *J. Neurosci. Res.*, **50**(10), 627 – 642 (1997).
27. M. Windisch, A. Gschanes, and B. Hutter-Paier, *Neural Transm. Suppl.*, **53**, 289 – 298 (1998).
28. R. Wronski, P. Tompa, and B. J. Hutter-Paier, *Neural Trans.*, **107**(2), 145 – 157 (2000).

Поступила 25.02.03

## NEUROACTIVATING MECHANISM OF ACTION OF THE NEW TROPHINOTROPIC DRUG CEREBRAL

A. N. Makarenko<sup>1</sup> and I. G. Vasil'eva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5A, Moscow, 117485 Russia;

<sup>2</sup> Romodanov Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Sciences of Ukraine, ul. Manuil'skogo 8, 03022 Kiev, Ukraine

The new drug cerebral, as well as its low-molecular-weight (LMW) fraction (MW, ≤ 500 Da) separated from a ready-to-use commercial form of this new neurotropic drug, increases the level of synthesis and secretion of the nerve growth factor (NGF) in rats under conditions of experimental hemorrhagic stroke (HS), while not influencing the NGF synthesis and secretion in intact animals. This neuroactivating effect of the trophinotropic drug cerebral and its LMW fraction in the acute HS development stage was observed upon intranasal administration. In comparison with parenteral (intraperitoneal) administration, the intranasal introduction provides for the optimum drug delivery to the CNS bypassing the blood – brain barrier. Trophinotropic agents are a new class of drugs with neuroactivating mechanism of action upon the NGF synthesis and secretion under HS conditions.